

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/EP200 4 / 0 0 2 8 2 0

Internationales Aktenzeichen

18 MAR 2004

Internationales Anmeldedatum

(18. 03. 2004)

EUROPEAN PATENT OFFICE
PCT INTERNATIONAL APPLICATION
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 049PCT 0135

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Zellpräparat und Verwendung des Präparats zur Behandlung von Gelenken und Knorpeldefekten, sowie Verfahren zur Herstellung

Feld Nr. II ANMELDER

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

WOHLRAB, David
Mörikestraße 13
D-06118 Halle
DE

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☒ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

WOHLRAB, Johannes
Schillerstraße 57
D-06114 Halle/S.
DE

Diese Person ist:

☒ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☒ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☐ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Pfenning, Meinig & Partner GbR
Mozartstrasse 17
D-80336 München
DE

Telefonnr.:

089/530 93 36

Telefaxnr.:

089/53 22 29

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anwalts beim Amt:

Zus.-Nr. 96

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNGEN

Die Einreichung dieses Antrags umfaßt gemäß Regel 4.9 Absatz a die Bestimmung aller Vertragsstaaten, für die der PCT am internationalen Anmeldedatum verbindlich ist, und insoweit verfügbar, für jede Art von Schutzrecht und sowohl für ein regionales als auch für ein nationales Patent.

Dennoch wird

- ☐ DE Deutschland nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt
- ☐ KR Republik Korea nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt
- ☐ RU Russische Föderation nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt

(Obenstehende Kästchen können angekreuzt werden, um die betreffenden Bestimmungen (unwiderruflich) auszuschließen, um zu vermeiden daß eine frühere nationale Anmeldung, deren Priorität beansprucht wird, nach nationalem Recht ihre Wirkung verliert. Siehe die Anmerkungen zu Feld Nr. V für die Folgen solcher nationalen Rechtsvorschriften in diesen und bestimmten anderen Staaten).

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit in Anspruch genommen:

Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat oder Mitglied der WTO	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 18. März 2003 (18/03/2003)	103 11 889.6	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☐ Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist (sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist):

☐ sämtliche Zeilen ☐ Zeile (1) ☐ Zeile (2) ☐ Zeile (3) ☐ weitere, siehe Zusatzfeld

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, geben Sie mindestens einen Staat an, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder Mitglied der Welthandelsorganisation ist und für den oder das die frühere Anmeldung eingereicht wurde:

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA / EPA

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

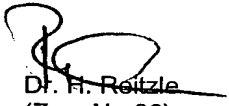
Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII ERKLÄRUNGEN

Die Felder Nr. VIII (i) bis (v) enthalten die folgenden Erklärungen (Kreuzen Sie unten die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte für jede Erklärung deren Anzahl an):

Anzahl der
Erklärungen

- ☐ Feld Nr. VIII (i) Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders :
- ☐ Feld Nr. VIII (ii) Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten :
- ☐ Feld Nr. VIII (iii) Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen :
- ☐ Feld Nr. VIII (iv) Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika) :
- ☐ Feld Nr. VIII (v) Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit :

Feld Nr. IX KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE	
<p>Diese internationale Anmeldung enthält:</p> <p>(a) auf Papier, die folgende Anzahl Blätter:</p> <p>Antrag (inklusive Erklärungsblätter) : 3</p> <p>Beschreibung (ohne Sequenzprotokoll und/oder diesbezügliche Tabellen) : 16</p> <p>Ansprüche : 5</p> <p>Zusammenfassung : 1</p> <p>Zeichnungen : _____</p> <p>Teilanzahl : 25</p> <p>Sequenzprotokoll : _____</p> <p>diesbezügliche Tabellen : _____</p> <p>(für beide, Anzahl der Blätter, soweit auf Papier eingereicht wird, unabhängig davon, ob zusätzlich auch in computerlesbarer Form eingereicht wird; siehe unter (c))</p> <p>Gesamtanzahl : 25</p> <p>(b) <input type="checkbox"/> ausschließlich in computerlesbarer Form (Abschnitt 801(a)(i))</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> Sequenzprotokoll</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> diesbezügliche Tabellen</p> <p>(c) <input type="checkbox"/> auch in computerlesbarer Form (Abschnitt 801(a)(ii))</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> Sequenzprotokoll</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> diesbezügliche Tabellen</p> <p>Art und Anzahl der Datenträger (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige) auf denen sich befinden</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> Sequenzprotokoll: _____</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> diesbezügliche Tabellen: _____</p> <p>(zusätzliche eingereichte Kopien unter Punkt 9(ii) und/oder 10(ii) in der rechten Spalte angeben)</p> <p>Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): _____</p>	<p>Dieser internationalen Anmeldung liegen die folgenden Unterlagen bei (kreuzen Sie die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte jeweils die Anzahl der beiliegenden Exemplare an)</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung : 1</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Original einer gesonderten Vollmacht : _____</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Original einer allgemeinen Vollmacht : folgt</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): _____</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift : _____</p> <p>6. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer(n) gekennzeichnet: _____ : folgt</p> <p>7. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: _____</p> <p>8. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material : _____</p> <p>9. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokoll in computerlesbarer Form (Art und Anzahl der Datenträger)</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung) : _____</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> (nur falls Felder (b)(i) oder (c)(i) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter : _____</p> <p>(iii) <input type="checkbox"/> zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Sequenzprotokoll identisch ist : _____</p> <p>10. <input type="checkbox"/> Tabellen in computerlesbarer Form im Zusammenhang mit Sequenzprotokoll (Art und Anzahl der Datenträger)</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater) (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung) : _____</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> (nur falls Felder (b)(ii) oder (c)(ii) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater) : _____</p> <p>(iii) <input type="checkbox"/> zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Tabellen identisch ist (sind) : _____</p> <p>11. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): Scheck : 1</p> <p>Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch</p>
<p>Feld Nr. X UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, DES ANWALTS ODER DES GEMEINSAMEN VERTRETERS</p> <p>Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.</p> <p> Dr. H. Reitzle (Zus.-Nr. 96)</p> <p>München, 18. März 2004</p>	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: 18 MAR 2004 (18.03.04)	2. Zeichnungen: <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Zellpräparat und Verwendung des Präparats zur Behand-
lung von Gelenken und Knorpeldefekten, sowie
Verfahren zur Herstellung

- 5 Die Erfindung betrifft neue intraartikulär, intradis-
cal, subcutan, intracutan oder epicutan (topisch) an-
wendbare Zellpräparate, welche humane oder tierische
Zellen enthalten, welche unter Zusatz einer die CD44
Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw.
10 Substanzgemischen kultiviert wurden, wobei das Präpa-
rat eine erhöhte CD44-Expression dieser Zellen auf-
weist. An die so vorbehandelten Zellen wird dann Hya-
luronsäure gebunden.
- 15 Diese Zellpräparate dienen der medizinischen Behand-
lung und/oder kosmetischen Anwendung. Die Erfindung
betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des
Präparates.

Die Arthrose beginnt mit einer initialen Schädigung des Knorpelgewebes aufgrund verschiedener Ursachen. Dabei tritt neben einer Reduktion der Anzahl intakter Chondrozyten auch eine reaktive Synovialitis auf, welche ihrerseits sowohl zu pathologischen Veränderungen der Synovialflüssigkeit u.a. zur Abnahme der Konzentration und des Molekulargewichtes Hyaluronsäure führt, sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren bewirkt. Dies führt zu einer sekundären Knorpelschädigung und damit letztendlich zur Arthrose, welche neben dem Knorpelgewebe auch alle anderen Gelenkstrukturen betrifft. Es ist bekannt, dass intraartikulär applizierte Hyaluronsäure zur Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit, zur Schmerzreduktion, zur Hemmung der Entzündungsprozesse und unter in vitro Bedingungen zur Steigerung der Chondrozyten-Proliferation führt (K.Kawasaki et al. (1999) Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. J Cell Physiol. 179:142-148; D.Wohlrab et al. (2000) Unterschiede in der Reaktion humaner Chondrozyten auf verschiedene Hyaluronsäurepräparate. hylan news. 2:2-5).

Die therapeutische Effektivität intraartikulär applizierter Hyaluronsäure ist von mehreren Faktoren abhängig. Bedingt durch die erhebliche Molekülgröße der Hyaluronsäure ($1-6 \times 10^6$ Da) muss diese mehrfach gespalten werden, bevor sie den intraartikulären Raum verlassen und ab- bzw. in Knorpelgewebe eingebaut werden kann. Diese Spaltungsprozesse nehmen in Abhängigkeit der Molmasse der Hyaluronsäure Stunden bis

mehrere Tage in Anspruch. Dieser Prozess wird auch wesentlich durch die Fähigkeit von Chondrozyten gesteuert, über Rezeptoren Hyaluronsäure zu binden, wodurch für Hyaluronsäure im Vergleich zu anderen, niedermolekularen Substanzen (wie z. B. Lokalanästhetika) eine verlängerte intraartikuläre Verweildauer nachzuweisen ist.

An der Oberfläche der Zellmembran von Chondrozyten werden die Matrixrezeptoren CD44 und/oder Integrine exprimiert. Beide Rezeptorfamilien spielen in der Homöostase des Gelenkknorpels eine zentrale Rolle. Insbesondere CD44 Rezeptoren, ein sehr variables und multifunktionelles Glykoprotein, wurde als der wesentlichste Zelloberflächenrezeptor für Hyaluronsäure erkannt (Proteins 39 (2000) 103-111). Der CD44-Rezeptor ist an der Oberfläche der Zellmembran vieler vitaler humaner Zellen lokalisiert. Er ist ein Hyaluronsäure-bindendes, membraninterkalierendes Glycoprotein, welches mit Zytoskelettproteinen interagiert. Es ist sowohl an der intrazellulären Signalweiterleitung als auch an einer Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Interaktion beteiligt. Der genaue Mechanismus dieser Vorgänge ist bisher nicht vollständig bekannt. CD44 besitzt eine hohe Affinität zur Hyaluronsäure. Geringere Affinitäten bestehen auch für Chondroitinsulfat und Heparansulfan.

Das CD44-Gen ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert. Es besteht aus 20 Exons, davon werden immer 10 exprimiert (CD44H). Die anderen 10 kodieren extrazelluläre Regionen (genannt v1-v10). Diese werden als unter-

schiedliche Splicevarianten bezeichnet. CD44-Isoformen sind in unterschiedlichen humanen Gewebearten (z.B. Tonsillen, Schilddrüse, Brust, Prostata, Cervix, Ösophagus, Epithel, Haut) nachgewiesen worden.

5

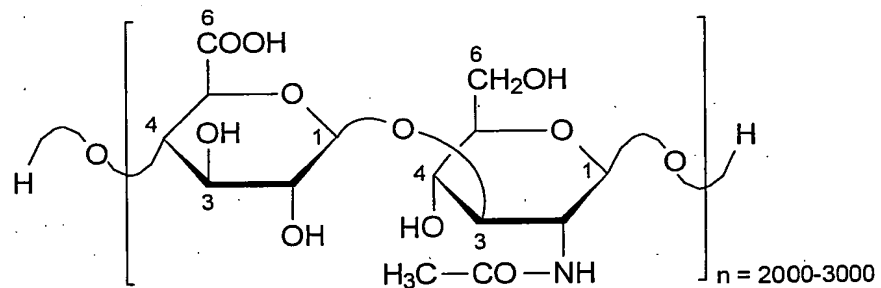
Auch an der Zellmembran humaner Chondrozyten wurde bereits der CD44-Rezeptor nachgewiesen. Die CD44-Expression der Chondrozyten im hyalinen Knorpelgewebe ist eine wesentliche Voraussetzung für die Bindung von Hyaluronsäure, wobei die Intensität der Hyaluronsäurebindung von der Anzahl, der Aktivierung und Intensität der Expression entsprechender Rezeptoren abhängig ist. Die im Knorpelgewebe gebundene Hyaluronsäure ist in der Lage, die entsprechenden Funktionen als Matrixbaustein zu erfüllen.

10

15

Die chemische Struktur der Hyaluronsäure (Hyaluronan) entspricht der Formel

20



25

Ungeachtet der positiven klinischen Erfahrungen mit hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. deren Salzen (Molmasse $> 1 \times 10^6$ Dalton), ist die Kenntnis über den Wirkmechanismus bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gelenkknorpels unvollständig. Der bisherige Wissenstand weist intraartikulär applizierte Hyal-

30

luronsäure als ein Schmier- und Gleitmittel aus.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Hyaluronsäure intraartikulär entzündungshemmende Eigenschaften besitzt. Die bisherigen Ergebnisse die mit hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. deren Salze erzielt wurden, sind jedoch in Bezug auf Regeneration der Gelenkstrukturen nicht befriedigend.

Somit bestand die Aufgabe, intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbare Zellpräparate zur Verfügung zu stellen, um eine verbesserte Regeneration von Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und/oder Gelenkfunktion und/oder Entzündungshemmung durch Hyaluronsäure und/oder deren Salze, verglichen mit der alleinigen Substitution der Hyaluronsäure, zu ermöglichen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein geeignetes Verfahren zur Herstellung eines derartigen Präparates anzugeben.

Die Aufgabe wird in Bezug auf das Zellpräparat durch die Merkmale des Patentanspruches 1 und in Bezug auf die Verwendung durch die Merkmale des Anspruches 15 gelöst. Das Verfahren zur Herstellung des Zellpräparates ist durch die Merkmale der Ansprüche 19 bis 21 gekennzeichnet. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Weiterbildungen an.

Erfindungsgemäß wird somit ein Zellpräparat zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier vorgeschlagen, das humane oder tierische Zellen enthält, die unter Zusatz einer die

CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemisch kultiviert wurden, wobei das Zellpräparat eine erhöhte CD44 Expression dieser Zellen aufweist. Dieses Zellpräparat zeigt ausgezeichnete Bindungseigenschaften für Hyaluronsäure, dessen Salze und/oder Fragment.

Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass ein derartiges Zellpräparat, das intraartikulär, intra-discal, subcutan oder intracutan angewendet werden kann, eine deutlich verbesserte Regeneration von Gelenkstrukturen verglichen mit der Hyaluronsäure und/oder dessen Salze zeigt.

Für das erfindungsgemäße Zellpräparat sind grundsätzlich alle humanen oder tierischen Zellen geeignet. Bevorzugt sind die Zellen autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs. Der Erfinder konnte zeigen, dass es dabei besonders bevorzugt ist, wenn die Zellen Chondrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und/oder Meniskuszellen sind. Die benutzten Zellen können aus Gewebe isoliert oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen z. B. Stammzellen oder Fibroblasten erhalten werden.

Besonders bevorzugt ist es dabei, wenn im Falle von Chondrozyten diese aus dem Knorpelgewebe isoliert wurden. Im Falle von Keratinozyten ist es günstig, wenn diese aus der Epidermis isoliert werden. Wenn Meniskuszellen eingesetzt werden, können diese aus dem Meniskusgewebe isoliert werden. Selbstverständlich können die vorstehend beschriebenen Zellen auch

durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen z. B. aus Stammzellen oder Fibroblasten erhalten werden.

5 Erfindungsgemäß umfasst die Erfindung bei der Hyaluronsäure auch dessen physiologisch verträgliche Salze sowie Spaltprodukte dieser Verbindungen. Die Erfindung schließt selbstverständlich auch Ausführungsformen ein, bei denen die Hyaluronsäure und die Spaltprodukte gemeinsam eingesetzt werden.

10 Es hat sich weiter gezeigt, dass es vorteilhaft ist, wenn der Anteil an der oder an den Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen von 0,001 bis 5,0 Gew.-% bezogen auf die gesamte galenische Formulierung beträgt.

20 Beim erfindungsgemäßen Zellpräparat ist es bevorzugt, wenn die Zellen Chondroitin sind. Selbstverständlich kann das Zellpräparat zusätzlich noch Chondroitinsulfat sowie Spaltprodukte dieser Verbindungen enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass beim Zellpräparat eine oder mehrere Bestandteile des physiologischen Knorpels (beispielsweise Glukosaminglykane oder Proteoglykane) enthalten sind. Auch ist es bevorzugt, wenn eine oder mehrere Substanzen mit Radikalfängereigenschaften enthalten sind. Beispiele hierfür sind Tocopherol oder Flavonoide. Weitere Substanzen die das Zellpräparat enthalten kann, sind eine oder mehrere Substanzen mit

steroidale oder corticosteroidale Wirkung, eine oder mehrere nicht steroidale Antiphlogistika (auch nicht steroidale Antirheumatika), eine oder mehrere Analgetika, eine oder mehrere Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Prostaglandinsynthese, insbesondere Lipoxygenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer und Phospholipase A2-Hemmer, eine oder mehrere wachstumsstimulierende oder wachstumsregulierende Substanzen sogenannte Wachstumsfaktoren, eine oder mehrere Vitamine, eine oder mehrere Antioxidantien und/oder eine oder mehrere Substanzen mit wasserbindenden Eigenschaften.

Als die CD44-Expression von Zellen, insbesondere Chondrozyten aktivierende Substanz wird bevorzugt mindestens ein Lokalanästhetikum oder Derivate dieser Verbindung eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Zellpräparat kann an und für sich in allen bekannten gängigen Formulierungen bereitgestellt werden. So ist es bevorzugt, das Zellpräparat in Form einer Matrix, einer Lösung, einer Suspension, einer Emulsion, einer Paste, einer Salbe, eines Gels, eine Creme oder einer Lotion oder eines Sprays anzuwenden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des vorstehend beschriebenen Zellpräparats zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des vor-

stehend beschriebenen Zellpräparats zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur intraartikulären, intradiscalen, subcutanen, intracutanen oder epicutanen (topisch) Anwendung.

Bevorzugt ist es dabei, wenn das Zellpräparat zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen menschlicher oder tierischer Gelenke angewendet wird.

Nachfolgend sind einige spezifische Verwendungen von ausgewählten Zellpräparaten angegeben.

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemischen, bevorzugt ein Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates,

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser Verbindungen und von einer die CD44 Expression

von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemisch zur Steigerung der humanen und/oder tierischen Chondrozytenproliferation,

5 - die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser
10 Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Veränderung der CD44-Rezeptorexpression

15 - die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser
20 Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Stabilisierung und/oder Regeneration von einzelnen oder mehreren Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und der Menisken,
25

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser
30 Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum

oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit,

5 - die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser
10 Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Hemmung von Entzündungsprozessen,

15 - die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser
20 Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Verbesserung der Schmerzreduktion.

25 Die Anwendung des erfindungsgemäßen Zellpräparates kann sowohl am Menschen als auch an Tieren erfolgen. Die erfindungsgemäßen Zellpräparate können sowohl in der Human- und in der Veterinärmedizin angewendet werden. Die Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen
30 Zellpräparate betreffen die Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkknorpel-, Knochen- und Knorpelknochendefekten, Meniskus- und Bandscheibenlä-

sionen sowie andere Knorpeldefekte (z.B. Nasen- und Ohrknorpel) auch unter kosmetischen Gesichtspunkten.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des vorstehend beschriebenen Zellpräparats. Erfindungsgemäß werden danach humane oder tierische Zellen unter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemisch hiervon kultiviert. Wesentlich ist nun, dass die CD44-Rezeptorexpression nur für eine bestimmte Zeit überproportional gesteigert wird. Es hat sich gezeigt, dass bei einer Zeitspanne für die Kultivierung der Zellen von 6 bis 15 Tage, bevorzugt 9 bis 11 Tage, ganz besonders bevorzugt nach 10 Tagen die CD44-Rezeptorexpression innerhalb von 12 bis 72 Stunden am besten ist. Innerhalb dieser Zeitspanne sind 24 bis 48 Stunden besonders günstig. Die Zellen besitzen während dieser Zeitspanne offensichtlich besonders viele freie Rezeptoren für CD44, so dass sie sich gut an die Hyaluronsäure binden.

Gegebenenfalls können weitere Wirk-Hilfe- und/oder Trägerstoffe zugesetzt werden um eine geeignete Formulierung zu erhalten. Nachfolgend sind geeignete Verfahren angegeben.

- Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates, wobei man humane Chondrozyten oder andere humane oder tierische Zellen, eine oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluron-

säure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemischen gegebenenfalls mit weiteren Wirkstoffen, Hilfs- und/oder Trägerstoffen in ein geeignetes Zellpräparat bringt.

- Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates, wobei man humane Chondrozyten oder andere humane oder tierische Zellen, eine oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression aktivierende Substanz bzw. Substanzgemischen und über den pH-Wert der Formulierung eine optimale Bindung der Zellen an Hyaluronsäure bzw. der Hyaluronsäure an die Zellen und/oder den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure und/oder den Spaltprodukten dieser Verbindungen erreicht.

Die Erfindung soll an einem konkreten Beispiel erläutert werden, ohne sie darauf zu beschränken:

Beispiel 1:

Beeinflussung der CD44-Rezeptorexpression humaner Chondrozyten durch Lidocain

5 Herstellung

Lidocainhydrochlorid (Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) lag primär in Pulverform vor. Dieses wurde in entsprechender Menge in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) gelöst, sodass eine Endkonzentration von 0,1 mmol/l Lidocain vorlag. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration. Die Substanzzugabe zur Zellkultur erfolgte beim letzten Mediumwechsel am 10. Kulturtag.

15

Präparation des biologischen Materials

Die Untersuchungen erfolgten an humanen Chondrozyten, welche aus arthrotisch verändertem Kniegelenksknorpel isoliert wurden. Das Knorpelgewebe entstammte den bei der Implantation von Knie totalendoprothesen resizierten femoralen Gelenkflächen. Es wurde ausschließlich arthrotisch verändertes Knorpelgewebe von drei verschiedenen Patienten ohne bekannte relevante Nebenerkrankungen, insbesondere ohne rheumatoide Arthritis, verwandt.

25

Die intraoperativ gewonnenen Knochen-Knorpelfragmente wurden zunächst in steriles L15 Medium (Seromed, Berlin) als Transportmedium überführt. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Ablösung des Knorpelgewebes vom subchondralen Knochen mittels

30

Skalpell sowie eine scharfe Durchtrennung des Gewebes in ca. 1mm³ große Stücke. Die enzymatische Isolierung der Chondrozyten aus den Knorpelstücken erfolgte mittels Pronase und Kollagenase A (Boehringer Mannheim) über eine Zeitspanne von 16 Stunden.

Versuchsbedingungen

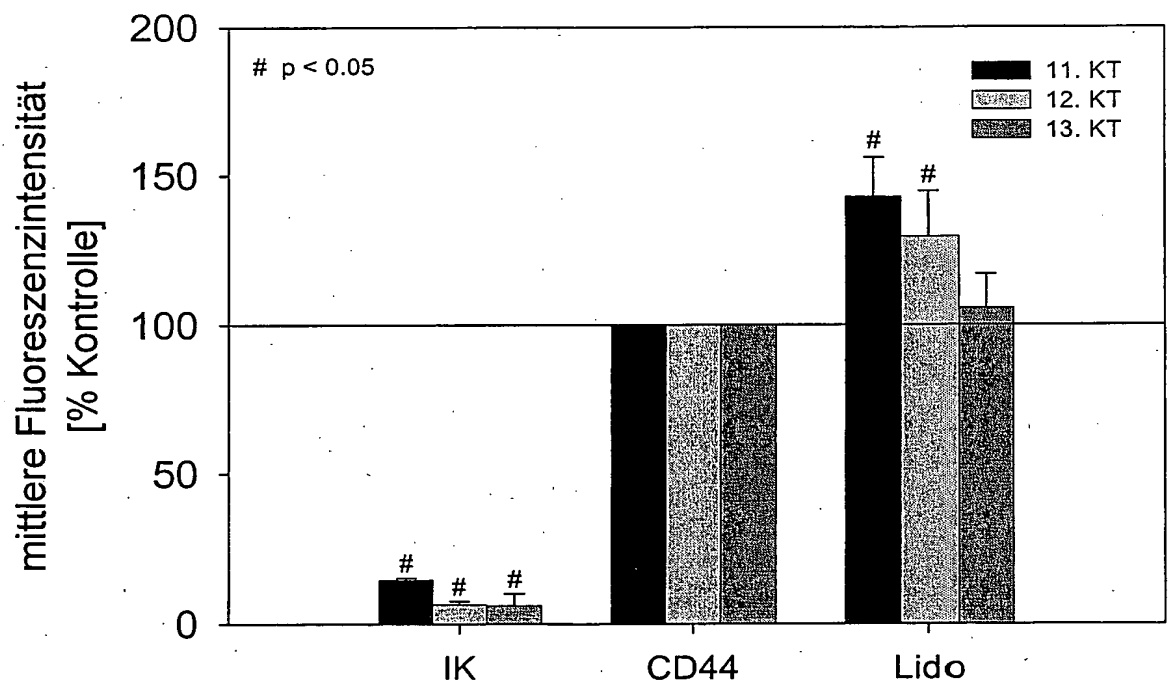
Die isolierten Chondrozyten wurden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) unter Zusatz verschiedener Antibiotika bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank als Monolayerkultur kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Am 10. Kulturtag erfolgte letztmalig ein Mediumwechsel. Hier erfolgte die Zugabe von Lidocain im Zellkulturmedium in einer Konzentration 0,1 mmol/l. Zusätzlich wurde jeweils eine unbehandelte Chondrozytenpopulation als Kontrolle mitgeführt. Die Kulturdauer betrug 11, 12 bzw. 13 Tage.

Versuchsdurchführung

Der Nachweis des CD44-Membranproteins bei humanen Chondrozyten erfolgte 24, 48 bzw. 72 Stunden nach Zugabe des Lidocains flowzytometrisch durch Vergleich mit der Isotypkontrolle (ms-IgG1-FITC, Mouse IgG1, DAKO Diagnostika GmbH, Mannheim). Dabei wurde die Anzahl der merkmals tragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten CD44-Antikörpers (anti-CD44H-FITC, DAKO) aufgetragen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Fig. 1 dargestellt.

Fig. 1: Flowzytometrische Bestimmung der CD44-Rezeptorexpression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss von 0,1 mmol/l Lidocain in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe von Lidocain am 10. Kulturtage. (N=5) (# signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (CD44), $p < 0,05$)



Patentansprüche

1. Zellpräparat zur therapeutischen und/oder kosme-
tischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier
enthaltend humane oder tierische Zellen, die un-
ter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zel-
len aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemi-
schen kultiviert wurden, an die Hyaluronsäure
und/oder deren physiologisch verträgliche Salze
und/oder Spaltprodukte hiervon gebunden sind.
2. Zellpräparat nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an der
oder an den Verbindungen ausgewählt aus Hyalu-
ronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen
der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten die-
ser Verbindungen von 0,001 bis 5,0 Gew.-% bezo-
gen auf die gesamte Formulierung beträgt.
3. Zellpräparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch ge-
kennzeichnet, dass die die CD44-Expression der
Zellen aktivierende Substanz mindestens ein Lo-
kalanästhetikum und/oder ein Derivat und/oder
eine Mischung hiervon ist.
4. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An-
sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die be-
nutzten Zellen autologen, allogenen, oder xeno-
genen Ursprungs sind.

5. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Chondrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und/oder Meniskuszellen sind.

5

6. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen aus Gewebe isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsysteme entstanden sind:

10

7. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Chondrozyten enthalten sind, die aus dem Knorpelgewebe isoliert wurden oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

15

8. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Keratinozyten enthalten sind, die aus der Epidermis isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

20

9. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Fibroblasten enthalten sind, die isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

25

10. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Meniskuszellen enthalten sind, die aus dem Meniskuskewebe isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.
- 5
11. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Chondroitin, Chondroitinsulfate sowie Spaltprodukte in diesen Verbindungen enthalten sind.
- 10
12. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein oder mehrere Bestandteile des physiologischen Knorpels enthalten sind.
- 15
13. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine oder mehrere Substanzen mit Radikalfängereigenschaften, eine oder mehrere Substanzen mit steroidaler oder corticosteroidaler Wirkung, eine oder mehrere nichtsteroidale Antiphlogistika, eine oder mehrere Analgetika, eine oder mehrere Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Prostaglandinsynthese, insbesondere Lipoxxygenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer und Phospholipase A2-Hemmer, eine oder mehrere wachstumsstimulierende oder wachstumsregulierende Substanzen (sogenannte Wachstumsfaktoren), eine oder mehrere Vitamine, eine oder mehrere Antioxydantien und/oder eine oder mehrere Substanzen mit wasserbindenden
- 20
- 25
- 30

Eigenschaften enthalten sind.

- 5 14. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es bevorzugt in Form einer Matrix, einer Lösung, einer Suspension, einer Emulsion, einer Paste, einer Salbe, eines Gels, einer Creme, einer Lotion oder eines Sprays vorliegt.
- 10 15. Verwendung eines Zellpräparates nach einem der vorhergehenden Ansprüche, zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier.
- 15 16. Verwendung eines Zellpräparates nach einem der Ansprüche 1 bis 15, zur Herstellung eines Arzneimittels.
- 20 17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan, intracutan oder epicutan (topisch) anwendbaren Transplantates.
- 25 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen menschlicher oder tierischer Gelenke, insbesondere zur Behandlung von traumatischen Erkrankungen aller menschlichen oder tierischen Gelenke, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe
- 30 von Gelenkerkrankungen und von Gelenkfunktionsstörungen, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkknorpel- und Knorpelknochen-

defekten, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Meniskus- und Bandscheibenerkrankungen, zur kosmetischen und/oder therapeutischen Behandlung von extraartikulären Knorpeldefekten und/oder zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gewebedefekten des Hautorgans zur medizinischen und/oder kosmetischen Anwendung.

19. Verfahren zur Herstellung einer Zellpräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 14, indem humane oder tierische Zellen, unter Zusatz einer die CD44-Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemischen kultiviert und an diese so vorbehandelten Zellen Hyaluronsäure und/oder deren physiologisch verträgliche Salze und/oder Spaltprodukte hiervon bindet.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung der Zellen über eine Zeitspanne von 6 bis 15, bevorzugt 9 bis 11 Tagen erfolgt und dann die die CD44-Expression aktivierende Substanz gesetzt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man 12 bis 72 Stunden, bevorzugt 24 bis 48 Stunden nach Zugabe der die CD44-Expression der Zellen aktivierende Substanz, die Hyaluronsäure und/oder deren Salze und/oder deren Fragment bindet.

Zusammenfassung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellpräparat
zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung
beim Menschen und/oder Tier enthaltend

a) humane oder tierische Zellen die

b) unter Zusatz einer CD44 Expression dieser Zellen
aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemischen

10 kultiviert wurden und eine erhöhte CD44-Expression
dieser Zellen vorliegt.